

METHOD FOR SUPPRESSING DENATURATION OF PROTEIN

Publication number: JP2002171984

Publication date: 2002-06-18

Inventor: IDENO AKIRA; MARUYAMA TADASHI

Applicant: MARINE BIOTECH INST CO LTD

Classification:

- international: C12N15/09; C12N9/90; C12N15/09; C12N9/90; (IPC1-7): C12N15/09; C12N9/90

- European:

Application number: JP20000371202 20001206

Priority number(s): JP20000371202 20001206

[Report a data error here](#)

Abstract of JP2002171984

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for suppressing the denaturation of a protein by heat or an organic solvent to prevent the irreversible formation of aggregates. **SOLUTION:** This method for suppressing the denaturation of a protein comprises making FKBP type PPIase that is derived from a thermophilic or hyperthermophilic archaea and has a molecular weight from 26 to 33 kDa coexist with the protein.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002-171984

(P2002-171984A)

(43)公開日 平成14年6月18日(2002.6.18)

(51)Int.Cl.⁷

C 12 N
15/09
9/90

識別記号

ZNA

F I

C 12 N
9/90
15/00

マーク*(参考)

4 B 0 2 4
Z N A A 4 B 0 5 0

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全 15 頁)

(21)出願番号

特願2000-371202(P2000-371202)

(22)出願日

平成12年12月6日(2000.12.6)

(71)出願人 591001949

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
東京都文京区本郷1丁目28番10号

(72)発明者 井手野 晃

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究
所内

(72)発明者 丸山 正

岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究
所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タンパク質の変性抑制法

(57)【要約】

【課題】 熱や有機溶剤などによるタンパク質の変性を抑制し、不可逆的な凝集形成を防ぐ手段を提供する。

【解決手段】 好熱性古細菌又は超好熱性古細菌に由来し、且つ、分子量が26-33 kDa であるFKBP タイプPPIase をタンパク質と共に存させることを特徴とするタンパク質の変性抑制法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)～(c)に示すタンパク質
 (a)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質
 (b)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、かつPPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質
 (c)配列番号1又は3記載の塩基配列により表されるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする超好熱性又は好熱性古細菌由来のタンパク質であって、PPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質

【請求項2】 請求項1記載のタンパク質を他のタンパク質と共に存させ、当該他のタンパク質の変性を抑制することを特徴とするタンパク質の変性抑制法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、熱などの環境ストレスによって生じるタンパク質の変性を抑制する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 タンパク質は複数のアミノ酸がペプチド結合により連なったポリペプチドである。タンパク質がその特性を発現するためには分子内または分子間の相互作用により形成される特有の三次構造（立体構造）が重要である。一般にタンパク質は熱などの環境的ストレスを加えると、その立体構造が変化し、その特性が不可逆的に消失してしまう場合が多い。従って、このような環境変化に対し、タンパク質をいかに安定な状態に保つかが、タンパク質を扱う上で常に課題として挙げられている。また、遺伝子組み換え技術による有用タンパク質生産において、大腸菌等の宿主菌内に過剰生産されたタンパク質が不活性な封入体として目的タンパク質が生産され、生産効率が低下するといった課題が挙げられている。

【0003】 上記問題点の解決策としてこれまで精力的に研究がなされ、さまざまな改善案が提案されている。近年、タンパク質の立体構造形成及び構造変化に関与する因子として分子シャベロンに注目が高まっている。分子シャベロンは熱ショックタンパク質の一群であり、細胞が温度変化など様々な環境ストレスにさらされた際に生産される。これらは原核生物、真核生物を問わず広く存在しており、特に大腸菌から生産される分子シャベロンとしてGroEが良く知られている。このGroEはタンパク質の種類を選ばず、非特異的にタンパク質の立体構造形成に関与することが明らかにされている。例えば上記GroEの構成体であるGroELは7個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計14サブユニットからなる特徴的な構造を有している。GroEL

10

は、ドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATPなどのヌクレオチドの消費と、補助因子であるGroESの結合に伴って、効率的に正しい立体構造のタンパク質へと折り畳むことが知られている。このシャベロニンをタンパク質の安定化に応用する試みがいくつかなされている。例えば特開平7-67641号公報には「酵素含有溶液にシャベロニンタンパク質及びATPなどのヌクレオチドを含有せしめ、溶液中の酵素を安定化する方法」が提案されている。また特開平7-48398号公報には、「化学的に変性された不活性タンパク質、遺伝子操作等で使用された形質転換体の中に蓄積された不活性なタンパク質などを活性タンパク質に再生させることを目的として、サーマス・サーモフィラス (*Thermus thermophilus*)より精製したシャベロニンを用いる方法」が提案されている。

【0004】 これらはいずれもシャベロニンが有するタンパク質の立体構造形成作用を利用したものであり、熱や変性剤によって立体構造が変形した際、タンパク質のポリペプチド鎖を本来の立体構造に巻き戻す（折り畳む）作用により、目的を達成するものである。

【0005】 しかしながら、シャベロニンは一般的にATP、CTP、UDPといった高エネルギー物質を共存させる必要がある。また、シャベロニンは目的タンパク質と1:1のモル比率で作用するため、分子量が100万Daに近い高分子量のシャベロニンでは、非常に高濃度のシャベロニンを用いる必要があり経済性に欠ける。

【0006】 一方、PPIase (Peptidyl prolyl cis-trans isomerase) は、免疫抑制剤として知られるサイクロスボリン及びFK506のターゲット分子であり、それぞれの免疫抑制剤に対する感受性からシクロフィリンタイプ及びFKBP (FK506 binding protein) タイプに大別される。また、両者の免疫抑制剤に非感受性でアミノ酸配列のホモジジーも異なるパーブリン (Parvulin) タイプが近年見つかってきている。PPIaseはポリペプチド鎖中プロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストランス異性化反応を触媒することにより、タンパク質高次構造の再生速度を促進させる機能 (PPIase活性) を有することから、上記シャベロニンと同様にタンパク質の安定化や不活性タンパク質の再生に利用できるものとして期待されていた。発明者らは、これまで古細菌由來のFKBPタイプPPIaseに着目し、研究を行ってきた。その結果、興味深いことに、それら由來のFKBPタイプPPIaseには、上記PPIase活性だけでなく、本来シャベロニンの機能とされていた、タンパク質巻き戻りの収量そのものを増大させる活性やタンパク質の不可逆的凝集を抑制する活性（シャベロン様活性）を有することを明らかにしてきた (Maruyama et al., 2000, *Front Biosci.* 2000 Sep 1, 5, D821-836)。PPIaseは上記シャベロンとは異なり、ATPなどといった高エネルギー物質が不要であるといった利点がある。

【0007】 さらに、これまで市販されているPPIase

20

30

40

50

は、例えはシグマ社からシクロフィリンタイプ及びFKBPタイプのものがそれぞれ2種類、1種類ずつ上市されているが、いずれも動物由来のものであり、その安定性は低く、4°Cまたは-20°Cという低温で保存する必要があった。このように動物由来のPPIaseは熱に非常に弱い。一方、古細菌由来のPPIaseは熱に強く、高温条件下に長時間放置されても活性を失わない。このため、古細菌由来のPPIaseは、新たなPPIase試薬としてその利用が期待されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】古細菌由来のPPIaseの大部分はFKBPタイプである。また、FKBPタイプのPPIaseは、分子量が17-18 kDa程度の短いタイプのものと分子量が26-33 kDa程度の長いタイプのものとに分類される(Maruyama, T and Furutani, M Front Biosci. 2000 Sep 1, 5, D821-836; Iida et al., 2000, Gene 256, 319-326)。古細菌由来の26-33 kDaからなるFKBPタイプPPIasesは、その約17-18 kDaからなるN末端ドメイン部分にPPIase活性を担う領域があり、残りのC末端ドメイン部分はタンパク質の凝集を抑制する機能を有する、2機能性のPPIaseである。26-33 kDaタイプのPPIaseのN末端ドメインは短いタイプのものと相同性の高い領域であるが、17-18 kDaタイプのものに比べPPIase活性が弱く、例えば、好熱性古細菌であるメタノコッカス・サモオートロフィカム(*Methanococcus thermoautotrophicum*)由来のPPIaseは、16 kDaタイプのPPIaseの1/1000以下程度の活性しか示さない(Ideno et al., 2000, Eur. J. Biochem 267, 3139-3148)。25-35 kDaタイプのPPIaseにおいても、高機能を示すものが見出されれば、その利用価値は非常に高い。本発明は、このような技術的背景の下になされたものであり、25-35 kDaタイプの高機能PPIaseを提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため銳意検討を重ねた結果、バイロコッカス・ホリコシ(*Pyrococcus horikoshii*)及びメタノコッカス・ヤナシイ(*Methanococcus jannaschii*)由来のPPIaseが、26-33 kDaタイプに属するものであるにもかかわらず、非常に強いシャベロン様活性を持つことを見出し、本発明を完成した。

【0010】即ち、本発明は、以下の(a)～(c)に示すタンパク質である。

(a)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質

(b)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、かつPPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質

(c)配列番号1又は3記載の塩基配列により表されるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下で

ハイブリダイズするDNAがコードする超好熱性又は好熱性古細菌由来のタンパク質であって、PPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質
また、本発明は、上記のタンパク質を他のタンパク質と共に存させ、当該他のタンパク質の変性を抑制することを特徴とするタンパク質の変性抑制法である。

【0011】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のタンパク質は、以下の(a)～(c)に示すタンパク質を含む。

(a)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質

(b)配列番号2又は4記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、かつPPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質

(c)配列番号1又は3記載の塩基配列により表されるDNA又はそれと相補的なDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAがコードする超好熱性又は好熱性古細菌由来のタンパク質であって、PPIase活性またはシャベロン様活性を有するタンパク質

(a)～(c)のタンパク質は、いずれも26-33 kDaのFKBPタイプのPPIaseである。(a)のタンパク質は、バイロコッカス・ホリコシ又はメタノコッカス・ヤナシイ由来のPPIaseである。

【0012】(b)のタンパク質は、(a)のタンパク質に、PPIase活性またはシャベロン様活性を失わせない程度の変異が導入されたタンパク質である。このような変異は、自然界において生じる変異のほかに、人為的な変異をも含む。人為的変異を生じさせる手段としては、部位特異的変異誘発法(Nucleic Acids Res. 10, 6487-6500, 1982)などを挙げることができるが、これに限定されるわけではない。変異したアミノ酸の数は、PPIase活性またはシャベロン様活性を失わせない限り、その個数は制限されないが、通常は、30アミノ酸以内であり、好ましくは20アミノ酸以内であり、更に好ましくは10アミノ酸以内であり、最も好ましくは5アミノ酸以内である。本発明でいうPPIase活性は、例えばフィッシャーらが提案したキモトリプシンカップルドアッセイで評価することができる(Fischer et al., 1984, Biomed. Biochem. Acta 43, 1101-1111)。一方、シャベロン様活性は、ロダネーゼやクエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素などをモデル酵素として(河田 1998, バイオサイエンスとインダストリー 56, 593-598)、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、PPIaseやシャベロンを含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や変性タンパク質の凝集の抑制率で評価することができる。変性タンパク質の再生率を評価する方法にはホロビッチらの方法が(Horowitz, 1995, Methods Mol. Bi

01.40,361-368)、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては田口らの方法(Taguchi et al. 1994, J.Bi oI.Chem.269, 8529-8534)などがそれぞれ挙げられる。

【0013】(c)のタンパク質は、DNA同士のハイブリダイゼーションを利用することにより得られる好熱性古細菌又は超好熱性古細菌由來のPPIaseである。(c)のタンパク質における「ストリンジエントな条件」とは、特異的なハイブリダイゼーションのみが起き、非特異的なハイブリダイゼーションが起きないような条件をいう。このような条件は、通常、「1×SSC, 0.1%SDS, 37°C」程度であり、好ましくは「0.5×SSC, 0.1%SDS, 42°C」程度であり、更に好ましくは「0.2×SSC, 0.1%SDS, 65°C」程度である。ハイブリダイゼーションにより得られるDNAは、配列番号1又は配列番号3記載の塩基配列により表されるDNAと通常高い相同意を有する。高い相同意とは、60%以上の相同意、好ましくは75%以上の相同意、更に好ましくは90%以上の相同意を指す。

【0014】本発明のタンパク質は、例えば、以下のような方法により得られる。まず、好熱性古細菌または超好熱性古細菌を培養し、得られた菌体をSDSなどの菌可溶化剤を用いて溶菌後、フェノール抽出及びエタノール沈殿法などの手法により、ゲノムDNAを抽出する。本発明で用いられる超好熱性又は好熱性古細菌としては、アシディアヌス(Acidianus)属、メタロスphaera(Metall osphaera)属、スティジオロバス(Stygiolobus)属、スルフォロバス(Sulfolobus)属、スルフロコッカス(Sulfuro coccus)属及びスルフルスピラエラ(Sulfurisphaera)属などのスルフォロバレス(Sulfolobales)目、アエロバイラム(Aeropyrum)属、デスルフロコッカス(Desulfurococ cus)属、ステッテリア(Stetteria)属、スタフィロサーマス(Staphylothermus)属、サーモディスカス(Thermodi scus)属、イグネオコッカス(Igneococcus)属、サーモスphaera(Thermosphaera)属及びスルフォフォボコッカス(Sulfophobococcus)属、ハイバーサーマス(Hyperther mus)属、バイロディクティウム(Pyrodictium)属及びバイロロバス(Pyrolobus)属などのイグネオコッカレス(Igneococcules)目、バイロバキュラム(Pyrobaculum)属、サーモプロテウス(Thermoproteus)属、サーモフィラム(Thermofilum)属及びカルドコッカス(Caldococcus)属などのサーモプロテアレス(Thermoproteales)目、アーキオグロブス(Archaeoglobus)属及びフェログロブス(Ferr oglobus)属などのアーキオグロバレス(Archaeoglobale s)目、メタノサーマス(Methanothermus)属、メタノバクテリウム(Methanobacterium)属、メタノサーモバクター(Methanothermobacter)属及びメタノスphaera(Methan osphaera)属などのメタノバクテリアレス(Methanobacte riales)目、メタノコッカス(Methanococcus)属、メタノサーモコッカス(Methanothermococcus)属、メタノカルドコッカス(Methanocaldococcus)属及びメタノイグニス(Methanoignis)属などのメタノコッカレス(Methanococc

ales)目、メタノミクロバイアレス(Methanomicrobiales)目、メタノザルチナ(Methanosarcina)属などのメタノザルチナレス(Methanosarcinales)目、メタノバイアレス(Methanopyrales)目、バイロコッカス(Pyrococcus)属及びサーモコッカス(Thermococcus)属などのサーモコッカレス(Thermococcales)目、サーモプラズマ(Thermoplasma)属及びピクロフィラス(Picrophilus)属などのサーモプラスマレス(Thermoplasmales)目などの古細菌が挙げられる。これらの古細菌の中でも超好熱性古細菌由來のものを使用するのが好ましく、とりわけバイロコッカス属及びメタノコッカス属の古細菌を使用するのが好ましい。

【0015】このようにして得られたゲノムDNAを適当な制限酵素で切断後、適当なベクターに連結し、ゲノムDNAライブラリーを作製する。ベクターには入ファージ由來の各種ベクター例えば入 λ t10や λ ZAPなどのファージミドDNA、あるいはpUC18やpBR322等のプラスミドベクターを用いることができる。

【0016】一方、異なる生物種由來のFKBPタイプPPIase遺伝子間でホモロジーの高い領域のアミノ酸配列をもとに、それに相当するDNAを合成し、PCRに用いるプライマーとする。ホモロジーの高い領域の一例としては、例えば、図1のPPIase中の25~32番目のアミノ酸配列、137~144番号のアミノ酸配列などを挙げることができる。このようなプライマーを用いて上記ゲノムDNAを鋳型とするPCRを行えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の部分断片を得ることができる。上記部分断片は[32 P]などの放射性元素や、ジコキシゲニンなどの非放射性化合物で標識することにより、遺伝子スクリーニングのプローブとして用いることができる。

【0017】本発明のタンパク質をコードする遺伝子の全塩基配列を得るためにには上記ゲノムDNAライブラリーを、大腸菌などの宿主に導入しておき、ラベル化した上記プローブと強く結合するクローナーを選択すればよい。塩基配列の決定はサンガー法やマキシム-ギルバート法といった一般的な方法によって決定することができる。以上の手順により、翻訳開始コドンから終止コドンを含む本発明のタンパク質をコードする全DNA塩基配列を単離することができる。上記操作により、単離した本発明のタンパク質をコードするDNAは適宜pETシステムなどの発現ベクターに挿入し、微生物や培養細胞に導入して発現させることにより、本発明のタンパク質を大量調製することが可能である。

【0018】不安定なタンパク質の変性抑制のためには、目的のタンパク質を本発明のタンパク質と共存させればよい。本発明のタンパク質は、耐熱性に優れるだけでなく、優れた耐冷性、耐有機溶媒性なども示すため、タンパク質の様々な変性に対して抑制効果を発揮する。共存させる手段としては、例えば、目的のタンパク質に本発明のタンパク質を混合する手段、本発明のタンパク

質を目的のタンパク質をコードするDNAと共に発現させる手段などを挙げることができる。目的のタンパク質と混和する場合、その比率はモル比で、目的タンパク質1に対し、0.1-500の比率が好適である。また、共発現は、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、例えばpACYC系プラスミドの発現プロモータの下流部に挿入しておけばよい。例えば、目的タンパク質がpETなどのc_OTE1系のDNA複製開始領域を持つ発現ベクターに挿入されている場合、pACYCベクターはそれらと宿主菌内で共存可能であるため、それぞれのプラスミドを別の薬剤耐性マークターを所有させておけば、両者の遺伝子は宿主内で共存する。両者の遺伝子はそれぞれのプロモーター制御下で発現が可能となる。逆に目的タンパク質をpACYC系に、PPIase遺伝子をc_OTE1系に組み込んでおいても差し支えない。この共発現系を利用すれば、例えば目的タンパク質を大腸菌などで発現する場合、封入体などの変性体として発現されるタンパク質を、可溶化画分に生産させることができとなる。本発明のタンパク質を共発現させれば、目的タンパク質の変性が抑制されると共に、PPIase活性及びシャペロン様活性などの効果により封入体形成が妨げられ、可溶化画分として生産される。本発明のタンパク質は耐熱性に優れ、運搬、保存などの際有利である。

[0019]

【実施例】以下、実施例により、本発明を説明するが、本発明の範囲はこれに限定されるものではない。

[実施例1] 超好熱性古細菌のゲノムDNAの調製

PPIase遺伝子は、バイロコッカス・ホリコシ及びメタノ*

*コッカス・ヤナシイよりクローニングした。バイロコッカス・ホリコシ(MD151)は理化研究所より入手し、メタノコッカス・ヤナシイは、DSMより入手した。

【0020】バイロコッカス・ホリコシ及びメタノコッカス・ヤナシイの菌懸濁液をそれぞれ約 $50\ \mu\text{l}$ 採取し、 $15000\ \text{rpm} \times 5\text{分間}$ 遠心分離することにより、菌体を回収した。TE緩衝液 $500\ \mu\text{l}$ にて2回菌体を洗浄した後、 0.1% SDSを含むTE緩衝液に懸濁し、 95°C にて60分間溶菌処理を行った。等量のTE緩衝液飽和フェノール及びクロロホルムにて除タンパク処理を行った後、エタノールにてそれぞれのゲノムDNAを沈殿させた。

【0021】【実施例2】PPIase遺伝子の増幅及びクリニシング

図1及び図2に示したバイロコッカス・ホリコシ由来PPIaseの配列情報及びメタノコッカス・ヤナシイ由来PPIaseの配列情報をもとに、バイロコッカス・ホリコシ由来のPPIase（以下、「PHFK」と略記する）遺伝子及びメタノコッカス・ヤナシイ由来のPPIase（以下、「MDFKL」）と略記する）遺伝子をPCR法によって増幅した。遺伝子 20 増幅用のプライマーとしては、PHFKについてはPHFK-F1 及びPHFK-R1を、MDFKLについてはMDFKL-F1及びMDFKL-R1をそれぞれ用いた（表1）。これらのプライマーには制限酵素サイトを設けた。また、PCRの反応組成及び反応サイクルは、それぞれ表2及び表3に示すとおりである。

[0022]

[表1]

ス・ホリヨシ及びメタノ*

PHFK 遺伝子及び MJFKL 遺伝子の増幅に用いたプライマー		
名称	配列	制限酵素 サイト
PHFK-F1	5'-CCCATATGAAGGTGGAGAGGGGAGATGTT-3'	Nde I
PHFK-R1	5'-GAAAGCTTTAAGAGGATTGCCTCTTC-3'	Hind III
MJFKL-F1	5'-CCATATGGTAGAAAAGGGTAAATGGTA-3'	Nde I
MJFKL-R1	5'-GGGGATCCCTTATTTGTTCTCTCTTATG-3'	Bam HI

アンダーライン: 各制限酵素サイト

[0023]

【表2】

PCR の反応組成

Reaction buffer($\times 10$)	$10\mu l$
dNTP	$8\mu l$
Ex Taq	$0.5\mu l$
ゲノムDNA($10ng/\mu l$)	$2\mu l$
Forward Primer($20pmol/\mu l$)	$4\mu l$
Reverse Primer($20pmol/\mu l$)	$4\mu l$
滅菌水	$71.5\mu l$
合計	$100\mu l$

[0024]

[表3]

10

プレヒート	95°C × 5min	1cycle
変性	96°C × 0.5min	
アニーリング	59°C × 1min	30cycle
増幅	72°C × 1min	

【0025】PCR法によって得られた各々の増幅産物を、2%アガロースゲル電気泳動により分離後、DNA断片を含むバンド部分を切り出し、フェノール・クロロホルム処理及びエタノール沈殿により目的DNAの抽出を行った。DNA断片を滅菌水に溶解し、各約10~100 ngに対して10倍量のpT7 blue Tプラスミドベクター (Novagen) を加え、さらに16°Cにて1時間処理することによりDNA断片をライゲーションした。

50 【0026】上記ライゲーション液をそれぞれコンピテ

ントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした。これら菌株の懸濁液を100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ アンビシリソナトリウム、100 μM IPTG及び0.004% X-Galを含有するLB寒天培地に接種し、一晩37°Cにて培養し、得られたホワイトコロニーについて、その菌株のゲノムDNAを錆型とするPCRを行い、DNA断片に対応するプライマーで増幅されるコロニーを陽性コロニーとした。陽性コロニーからpT7プラスミドDNAを回収した後、プラスミドを錆型とし、BIG Dye (PERKIN-ELMER)を用いたシーケンス反応(プライマーはT7プロモータープライマー及びU-19リバースプライマー)を行うことにより、得られたPCR産物の塩基配列を決定した。この配列をデータベース上のバイロコッカス・ホリコシまたはメタノコッカス・ヤナシイのゲノムDNAの塩基配列と比較した結果、PPIase遺伝子の配列と相違ないことを確認した。バイロコッカス・ホリコシ及びメタノコッカス・ヤナシイのPPIase遺伝子の塩基配列をそれぞれ配列番号1及び配列番号3に、それから推定されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号2及び配列番号4に示す。

【0027】〔実施例3〕 PPIaseの発現系構築

PPIase遺伝子を含むそれぞれのpT7 blueプラスミドDNAについて制限酵素処理を行い、PPIase遺伝子断片の切り出しを行った。制限酵素はNde I及びHind IIIの組み合わせをそれぞれ用いた。切断した遺伝子断片は2%アガロースゲルにより、分離・抽出した後、あらかじめ制限酵素処理したpET21aプラスミドDNA (Novagen)にライゲーションした。得られたライゲーション反応液をコンビテントセル大腸菌JM109株に加えることによりトランスフォーメーションした後、PPIase遺伝子を含む陽性コロニーからpET21aプラスミドDNAを回収し、このプラスミドをコンビテントセル大腸菌BL21 (DE3)株にトランスフォーメーションした。

【0028】〔実施例4〕 PPIaseの精製

得られた組み換え大腸菌を用いてPHFK及びMJFKLの発現を試みた。2Lの三角フラスコに2×YT培地 (Yeast Extract 16 g L⁻¹, BACTO TRYPTON 20 g L⁻¹, NaCl 5 g L⁻¹, アンビシリソナトリウム 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, pH 7.5) 700 mLを入れ、PHFK遺伝子又はMJFKL遺伝子を含む組み換え大腸菌2~3白金耳を接種した。35°Cで2時間回転培養 (110 rpm) した後、遠心分離 (10000 rpm × 10 min) にて菌体を回収した。得られた菌体は1 mM EDTAを含む25 mM HEPES緩衝液 (pH 6.8) 20 mLに懸濁し、-20°Cにて一晩凍結保存した。菌体を超音波破碎後、下記に示したa~dの陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濃過の順でカラム精製を繰り返した。精製した菌体破碎液をSDS-PAGEで分離したところ、MJFKLを発現させた大腸菌の場合も(図3 レーン4)、PHFKを発現させた大腸菌の場合も(図3 レーン6)ともに単一のバンドとして検出された。なお、図3中のレーン1は分子量マーカー、レーン2は野生型大腸菌の菌体破碎液、レーン3はMJFKLを発現させた大

腸菌の未精製菌体破碎液、レーン5はPHFKを発現させた大腸菌未精製菌体破碎液を試料としとしている。

【0029】a. DEAE Toyopearl column (16 mm × 60 cm; TOSOH Co., Ltd.)

A液: 25 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

B液: 0.5 M NaCl を含む25 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

(0~300 min: B液0~100%の直線グラジエント、300~420 min: B液100%)

流速: 1 mL min⁻¹

b. HiLoad 26/60 Superdex 200pg column (26 mm × 60 cm; Amersham Pharmacia)

溶離液: 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0; 0.15 M NaCl含有)

流速: 3 mL min⁻¹

c. TSKgel SuperQ-5PW column (7.5 mm × 7.5 cm; TOSOH Co., Ltd.)

A液: 25 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

B液: 0.5 M NaCl を含む25 mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

(0~10 min: B液0%、10~60 min: B液0~100%の直線グラジエント)

流速: 1 mL min⁻¹

d. TSKgel G3000 SW_{XL} column (7.5 mm × 30 cm; TOSOH Co., Ltd.)

溶離液: 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0; 0.15 M NaCl含有)

流速: 0.5 mL min⁻¹

【0030】〔実施例5〕 PHFKのタンパク質熱変性抑制効果(1)

大腸菌(BL21 DE3)の菌体破碎液上清液の熱変性に対するPHFKの影響を検討した。すなわち、PHFKを発現させた大腸菌を超音波破碎し、遠心分離により上清を得た。タンパク質濃度を2.5 mg/mLとし、20~100 °Cの温度範囲にて30分間熱処理した。遠心分離の後、上清について16%アクリルアミドゲルを用いたSDS電気泳動で、上清に残存するタンパク質を検出した(図4)。また、上清の残存タンパク質濃度を定量した(図5)。対照として、PHFKを発現させた大腸菌の代わりに野生型大腸菌を用い、上清中のタンパク質の検出及び定量を行った。

【0031】図4及び図5に示すように、PPIaseが存在する場合には大腸菌の大部分のタンパク質が凝集せず、上清中に残存していた。一方、PPIaseが存在しない場合には、処理温度の上昇に伴い検出タンパク質の量が少くなり、高温処理時には上清中にはほとんどタンパク質が残存していなかった。

【0032】〔実施例6〕 PHFKのタンパク質熱変性抑制効果(2)

野生型大腸菌(BL21 DE3)を超音波破碎し、遠心分離により上清を得た。タンパク質濃度を2.1 mg/mLとし、さらに

11

12

PHFKを最終濃度1mg/mlとなるように添加し、20~100°Cの温度範囲にて30分間熱処理した。遠心分離の後、上清について16%アクリルアミドゲルを用いたSDS電気泳動で、上清に残存するタンパク質を検出した(図6)。対照として、PHFKを添加せずに上清に残存するタンパク質の検出を行った。

【0033】図6に示すように、PPIaseを添加した場合には大腸菌の大部分のタンパク質は残存したが、PPIaseを添加しなかった場合には検出されるタンパク質の量は処理温度の上昇に伴い減少していた。

*【0034】

【発明の効果】本発明により、熱や有機溶剤などによるタンパク質の変性を抑制し、不可逆的な凝集形成を防ぐことができる。また、この変性抑制効果により、組み換えタンパク質生産において問題となる、封入体形成を抑制することができる。その他、本発明は、変性タンパク質の再生、タンパク質試薬の安定化、さらには新規免疫抑制剤、生理活性物質の探索に有用である。

【0035】

*10 【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.
<120> METHOD FOR RETARDING DENATURATION OF PROTEIN
<130> P00-0472
<160> 8
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 774
<212> DNA
<213> Pyrococcus horikoshii
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(771)
<400> 1
atq aaq gtq gaa agg gga gat gtt atc agg ctc cac tat acc ggt agg 48
Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Val Ile Arg Leu His Tyr Thr Gly Arg
1 5 10 15
gtt aaa gag act gga caa ata ttt gac acc act tac gaa gaa gtq gcc 96
Val Lys Glu Thr Gly Gln Ile Phe Asp Thr Thr Tyr Glu Glu Val Ala
20 25 30
aaa gaa gcg gga ata tat aat cca aag ggg atc tac ggt cca gtt cca 144
Lys Glu Ala Gly Ile Tyr Asn Pro Lys Gly Ile Tyr Gly Pro Val Pro
35 40 45
ata atc gtc gga gct ggt cac gtc att tct gga tta gac aag agg ctg 192
Ile Ile Val Gly Ala Gly His Val Ile Ser Gly Leu Asp Lys Arg Leu
50 55 60
gta gga ctt gaa gta gga aag aag tac acc tta gag gtt cca cca gag 240
Val Gly Leu Glu Val Gly Lys Tyr Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu
65 70 75 80
gaa gga ttt gga cta agg cat ccc aag ctg att aag gta ttc acg atg 288
Glu Gly Phe Gly Leu Arg Asp Pro Lys Leu Ile Lys Val Phe Thr Met
85 90 95
gga caa ttt aga aag cag ggg ata gtt cca ttc cca gga tta gaa gta 336
Gly Gln Phe Arg Lys Gln Gly Ile Val Pro Phe Pro Gly Leu Glu Val
100 105 110
gaa gtc acg act gac aat gga agg aag atg aaa ggt agg gta att aca 384
Glu Val Thr Thr Asp Asn Gly Arg Lys Met Lys Gly Arg Val Ile Thr
115 120 125

(8)

特開2002-171984

13

14

gtt agc gga ggt agg gtt aca gac ccc cta gcc gga	432
Val Ser Gly Gly Arg Val Arg Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly	
130 135 140	
aaa acc ctt att tat gag gtg gag att gtt gag aag atc gaa gat cca	480
Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Val Glu Ile Val Glu Lys Ile Glu Asp Pro	
145 150 155 160	
ata gag aag ata aaa gcc cta ata gag ctg agg tta cca atg atc gat	528
Ile Glu Lys Ile Lys Ala Leu Ile Glu Leu Arg Leu Pro Met Ile Asp	
165 170 175	
agg gat aag gta ata atc gaa gtt gga gaa aag qat gtt aag gta aac	576
Arg Asp Lys Val Ile Glu Val Gly Glu Lys Asp Val Lys Val Asn	
180 185 190	
ttt ggt gag caa gat gtt gat ccc aag acg ctg atc ctg gga gaa att	624
Phe Gly Glu Gln Asp Val Asp Pro Lys Thr Leu Ile Leu Gly Glu Ile	
195 200 205	
ctt ttg gag agt gat att aaa ttc ctg gga tat qag aag gtt gaa ttt	672
Leu Leu Glu Ser Asp Ile Lys Phe Leu Gly Tyr Glu Lys Val Glu Phe	
210 215 220	
aaa cct agt gtt gaa qaq ttg ttg agg ccc aag cag gaa gaa ccc gtt	720
Lys Pro Ser Val Glu Glu Leu Leu Arg Pro Lys Gln Glu Glu Pro Val	
225 230 235 240	
gaa gag gag aaa aag gag gag caa gaa gag agt gaa gag gcg caa tcc	768
Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gln Glu Glu Ser Glu Glu Ala Gln Ser	
245 250 255	
tct taa	774
Ser	
<210> 2	
<211> 257	
<212> PRT	
<213> Pyrococcus horikoshii	
<400> 2	
Met Lys Val Glu Arg Gly Asp Val Ile Arg Leu His Tyr Thr Gly Arg	
1 5 10 15	
Val Lys Glu Thr Gly Gln Ile Phe Asp Thr Thr Tyr Glu Glu Val Ala	
20 25 30	
Lys Glu Ala Gly Ile Tyr Asn Pro Lys Gly Ile Tyr Gly Pro Val Pro	
35 40 45	
Ile Ile Val Gly Ala Gly His Val Ile Ser Gly Leu Asp Lys Arg Leu	
50 55 60	
Val Gly Leu Glu Val Gly Lys Lys Tyr Thr Leu Glu Val Pro Pro Glu	
65 70 75 80	
Glu Gly Phe Gly Leu Arg Asp Pro Lys Leu Ile Lys Val Phe Thr Met	
85 90 95	
Gly Gln Phe Arg Lys Gln Gly Ile Val Pro Phe Pro Gly Leu Glu Val	
100 105 110	
Glu Val Thr Thr Asp Asn Gly Arg Lys Met Lys Gly Arg Val Ile Thr	
115 120 125	
Val Ser Gly Gly Arg Val Arg Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly	
130 135 140	
Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Val Glu Ile Val Glu Lys Ile Glu Asp Pro	

(9)

特開2002-171984

15

16

145	150	155	160
Ile Glu Lys Ile Lys Ala Leu Ile Glu Leu Arg Leu Pro Met Ile Asp			
165	170	175	
Arg Asp Lys Val Ile Ile Glu Val Gly Glu Lys Asp Val Lys Val Asn			
180	185	190	
Phe Gly Glu Gln Asp Val Asp Pro Lys Thr Leu Ile Leu Gly Glu Ile			
195	200	205	
Leu Leu Glu Ser Asp Ile Lys Phe Leu Gly Tyr Glu Lys Val Glu Phe			
210	215	220	
Lys Pro Ser Val Glu Glu Leu Leu Arg Pro Lys Gln Glu Glu Pro Val			
225	230	235	240

Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gln Glu Glu Ser Glu Glu Ala Gln Ser
245 250 255

Ser

<210> 3

<211> 696

<212> DNA

<213> Methanococcus jannaschi

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(693)

<400> 3

atg gta gaa aag ggt aaa atg gta aag att agc tat gac gga tac gtt	48
Met Val Glu Lys Gly Lys Met Val Lys Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Val	

1	5	10	15
---	---	----	----

gat gga aaa cta ttt gat aca act aac gaa gaa ttg gct aaa aaa gag	96
Asp Gly Lys Leu Phe Asp Thr Thr Asn Glu Glu Leu Ala Lys Lys Glu	

20	25	30
----	----	----

ggg att tac aac cct gca atg att tat ggt cct gtt gct atc ttt gct	144
Gly Ile Tyr Asn Pro Ala Met Ile Tyr Gly Pro Val Ala Ile Phe Ala	

35	40	45
----	----	----

gga gaa gga caa gta tta cct gga tta gac gaa gcc ata tta gaa atg	192
Gly Glu Gly Gln Val Leu Pro Gly Leu Asp Glu Ala Ile Leu Glu Met	

50	55	60
----	----	----

gat gtt ggt gag gaa aqa gaa gtt gtt tta cct cca qaq aaa gct ttt	240
Asp Val Gly Glu Glu Arg Glu Val Val Leu Pro Pro Glu Lys Ala Phe	

65	70	75	80
----	----	----	----

ggt aag aqa gac cca tca aag ata aaa tta atc cca tta tca gaa ttt	288
Gly Lys Arg Asp Pro Ser Lys Ile Lys Leu Ile Pro Leu Ser Glu Phe	

85	90	95
----	----	----

aca aaa aqa gga att aqg cca ata aaa gga tta acc ata act att gat	336
Thr Lys Arg Gly Ile Lys Pro Ile Lys Gly Leu Thr Ile Thr Ile Asp	

100	105	110
-----	-----	-----

gga att cct gga aaa att gtt aqc ata aac aqt gga aqa gtt tta gtc	384
Gly Ile Pro Gly Lys Ile Val Ser Ile Asn Ser Gly Arg Val Leu Val	

115	120	125
-----	-----	-----

gat ttt aac cat gaa tta gct gga aaa gag gta aaa tat agg ata aaa	432
Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Val Lys Tyr Arg Ile Lys	

130	135	140
-----	-----	-----

(10)

特開2002-171984

17

18

att gaa gaa gtt gtt gat gat aaa aag aat att gta aaa gaa att gta 480
 Ile Glu Glu Val Val Asp Asp Lys Lys Asn Ile Val Lys Glu Ile Val
 145 150 155 160
 aaa atg tat gtt cca aga ttg aqt gat gta aaa gta act atc aga aat 528
 Lys Met Tyr Val Pro Arg Leu Ser Asp Val Lys Val Thr Ile Arg Asn
 165 170 175
 gga aca gtt aag ata gaa ttg cct gaa ttt gct cca ttt att cca aac 576
 Gly Thr Val Lys Ile Glu Leu Pro Glu Phe Ala Pro Phe Ile Pro Asn
 180 185 190
 att caa aca gct aag atg gct att gct aac gaa ata ttg aag aga tta 624
 Ile Gln Thr Ala Lys Met Ala Ile Ala Asn Glu Ile Leu Lys Arg Leu
 195 200 205
 gaa gat gct gaa aaa gtt aqc ttt gtt gag aca ttt gaa aga aaa aag 672
 Glu Asp Ala Glu Lys Val Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Arg Lys Lys
 210 215 220
 qaa act aaa gaa qaq aac aaa taa 696
 Glu Thr Lys Glu Glu Asn Lys
 225 230
 <210> 4
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Methanococcus jannaschi
 <400> 4
 Met Val Glu Lys Gly Lys Met Val Lys Ile Ser Tyr Asp Gly Tyr Val
 1 5 10 15
 Asp Gly Lys Leu Phe Asp Thr Thr Asn Glu Glu Leu Ala Lys Lys Glu
 20 25 30
 Gly Ile Tyr Asn Pro Ala Met Ile Tyr Gly Pro Val Ala Ile Phe Ala
 35 40 45
 Gly Glu Gly Gln Val Leu Pro Gly Leu Asp Glu Ala Ile Leu Glu Met
 50 55 60
 Asp Val Gly Glu Glu Arg Glu Val Val Leu Pro Pro Glu Lys Ala Phe
 65 70 75 80
 Gly Lys Arg Asp Pro Ser Lys Ile Lys Leu Ile Pro Leu Ser Glu Phe
 85 90 95
 Thr Lys Arg Gly Ile Lys Pro Ile Lys Gly Leu Thr Ile Thr Ile Asp
 100 105 110
 Gly Ile Pro Gly Lys Ile Val Ser Ile Asn Ser Gly Arg Val Leu Val
 115 120 125
 Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Val Lys Tyr Arg Ile Lys
 130 135 140
 Ile Glu Glu Val Val Asp Asp Lys Lys Asn Ile Val Lys Glu Ile Val
 145 150 155 160
 Lys Met Tyr Val Pro Arg Leu Ser Asp Val Lys Val Thr Ile Arg Asn
 165 170 175
 Gly Thr Val Lys Ile Glu Leu Pro Glu Phe Ala Pro Phe Ile Pro Asn
 180 185 190
 Ile Gln Thr Ala Lys Met Ala Ile Ala Asn Glu Ile Leu Lys Arg Leu
 195 200 205

(11)

特開2002-171984

19

20

Glu Asp Ala Glu Lys Val Ser Phe Val Glu Thr Phe Glu Arg Lys Lys

210

215

220

Glu Thr Lys Glu Glu Asn Lys

225

230

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

cccatatgaa ggtggagagg ggagatgtt

30

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

ggaaqcttt aaqaggattq cgcctttc

29

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

ccatatggta gaaaagggtt aaatggta

28

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ggggatccctt atttgttctc ttcttttgt

29

【図面の簡単な説明】

【図1】PHFK遺伝子の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列を示す図

【図2】MJKL遺伝子の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列を示す図

【図3】MJKL又はPHFKを発現する大腸菌の菌体破碎液の電気泳動図

30 【図4】PHFK存在及び非存在下における菌体破碎液上清の電気泳動図

【図5】PHFK存在及び非存在下における菌体破碎液上清中のタンパク質量を示す図

【図6】PHFK添加及び無添加時における菌体破碎液上清の電気泳動図

【図1】

PHFK-F1

1 ATGAGGGTGGAGAGGGAGATGTATCAGGCTCCACTATAACCGTAGGGTAAAGAGACT 60
M K V E R G D V I R L H Y T G R V K E T

61 GGACAAATATTGACACCACTTACGAAGAAGTGGCAAAGAACGGGAATATATAATCCA 120
G Q I F D T T Y E E V A K E A G I Y N P

121 AAGGGATCTACGGTCCAGTTCCAATAATCGTCGGAGCTGGTCACGTCAATTCTGGATTA 180
K G I Y G P V P I I V G A G H V I S G L

181 GACAAGAGGCTGGTAGGACTTGAAGTAGGAAAAGTACACCTTAGAGGTTCCACCAGAG 240
D K R L V G L E V G K K Y T L E V P P E

241 GAAGGATTGGACTAAGGGATCCCAAGCTGATTAAGGTATTACCGATGGGACAATTAGA 300
E G F G L R D P K L I K V F T M G Q F R

301 AACGCAGGGATAAGTCCATTCCAGGATTAGAAGTAGAAGTCACGACTGACAATGGAAGG 360
K Q G I V P F P G L E V E V T T D N G R

361 AAGATGAAAGTAGGTAATTACAGTAAGCGGAGGTAGGGTAGAGTTGATTTAACAC 420
K M K G R V I T V S G G R V R V D F N H

421 CCCCTAGCCCCAAAAACCCATTATGAGGTGAGATTGTTGAGAAGATCGAAGATCCA 480
P L A G K T L I Y E V E I V E K I E D P

481 ATAGAGAAGATAAAAGCCCTAATAGAGCTGAGGTACCAATGATCGATAGGATAAGGT 540
I E K I K A L I E L R L P M I D R D K V

541 ATAATCGAAGTTGGAGAAAAGGATGTTAAGGTAACCTTGGTAGGCAAGATGTTGATCCC 600
I I E V G E K D V K V N F G E Q D V D P

601 AAGACGCTGATCCTGGAGAAATTCTGGAGAGTCATATTAAATTCTGGATATGAG 660
K T L I L G E I L L E S D I K F L G Y E

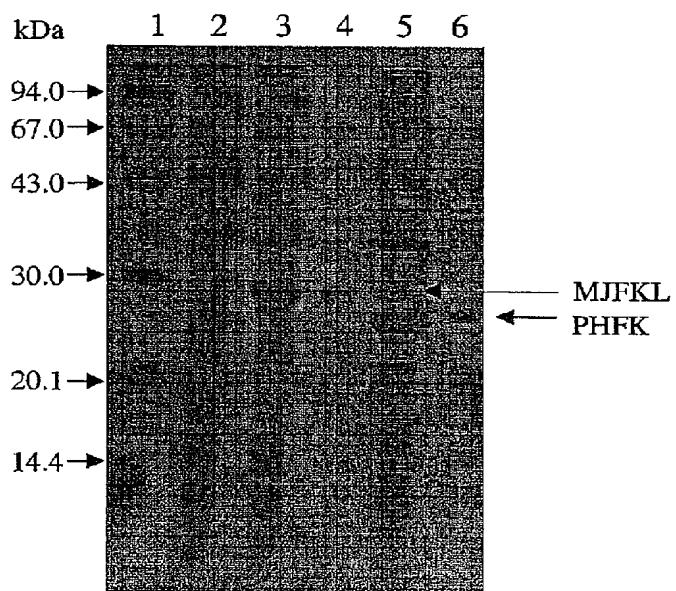
661 AAGGTTGAATTAAACCTAGTGTTGAAGAGTTGAGGCCAAAGCAGGAAGAACCGTT 720
K V E F K P S V E E L L R P K Q E E P V

721 GAAGAGGAGAAAAGGAGGAGCAAGAAGAGAGTGAAGAGGCCAATCCTCTAA 774
E E E K K E E Q E E S E E A Q S S *

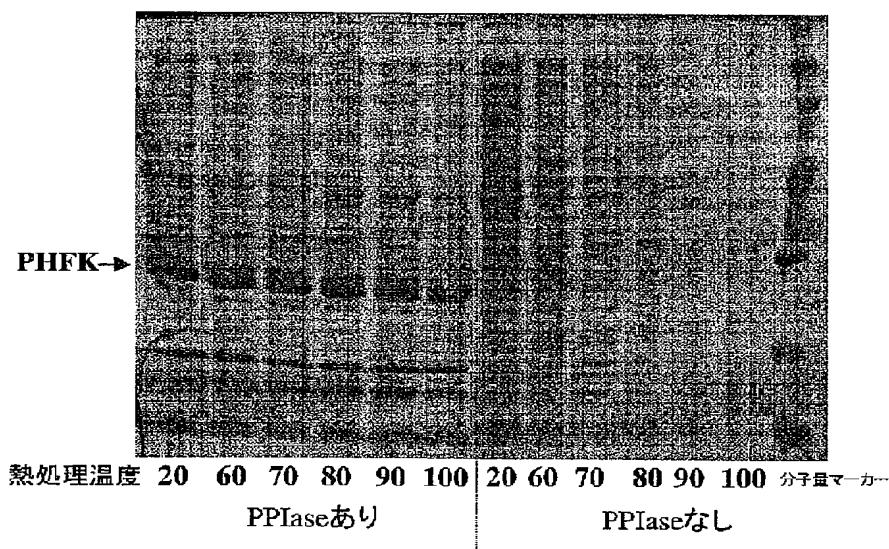
PHFK-R1

[図2]

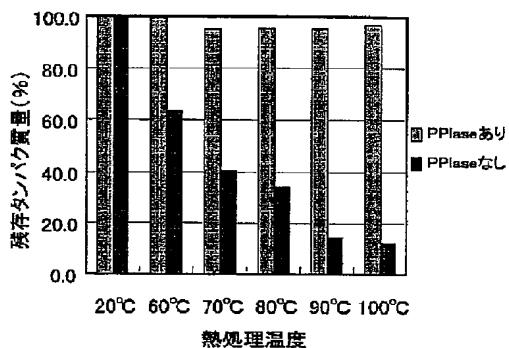
【図3】



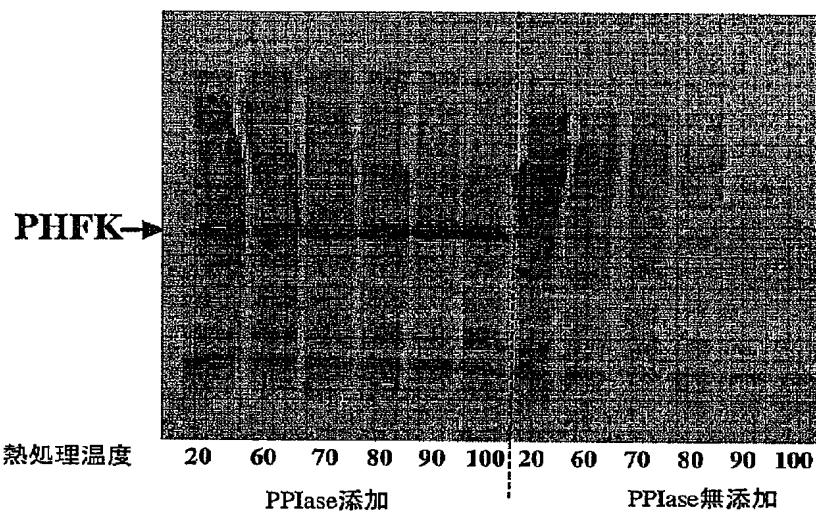
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA07 CA03 DA06 EA04
 GA11 HA01 HA12
 4B050 CC03 DD02 FF11E FF12E